

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Martin Štach

Interakce jaderné membrány
Nuclear envelope interactions

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22. 8. 2014

Podpis

Děkuji doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc. za nesmírnou ochotu, trpělivost a rady při psaní této práce.

Abstrakt

Jaderná membrána se skládá z vnitřní membrány a vnější membrány, která je pokračováním drsného ER. Lipidy membrány mají i signální funkce. Gangliosid GM1 pomáhá regulovat koncentraci Ca^{2+} v jádře. Proteomické studie odhalily v jaderných membránách kolem 100 proteinů. Nicméně pouze u malé části z nich byly dosud zjištěny jejich funkce. LEM proteiny (LAP2, emerin, MAN1) interagují s faktorem BAF propojujícím je s laminou a chromatinem. Hlavní funkcí LAP1 a LAP2 je vazba laminů. Emerin váže transkripční represory, podílí se na signalizaci a sestřihu RNA. MAN1 váže laminy a LEM2 hraje úlohu v určení tvaru jádra. LBR asociuje s laminem B, DNA a proteiny vážící heterochromatin. LINC komplex složený z nesprinů a SUN proteinů propojuje cytoskelet s nukleoskeletem. Transport proteinů do vnitřní membrány je zajišťován přes jaderný pór několika různými mechanismy. Přestože se v posledních letech zintenzivnil výzkum této důležité buněčné struktury, bude zapotřebí ještě mnoho úsilí k získání úplného obrazu struktury a funkce jednotlivých složek jaderné membrány.

Klíčová slova: jaderná membrána, emerin, LBR, LAP, MAN1, LINC, transport

Abstract

The nuclear envelope is composed of the inner membrane and outer membrane, which is a continuation of the rough ER. Lipids of the nuclear envelope compossess signaling functions. Ganglioside GM1 helps to regulate the concentration of Ca^{2+} in the nucleus. . Proteomic studies revealed about 100 proteins present in membranes nuclear envelope. Nevertheless, no functions for most of them were uncovered. LEM proteins (LAP2, emerin, MAN1) interact with BAF factor linking them to the lamina and chromatin. The main function of LAP1 and LAP2 is association with lamins. Emerin binds transcriptional repressors, is involved in signaling and RNA splicing. MAN1 binds lamins. LEM2 plays a role in nuclear morphology arrangement. LBR associates with lamin B, DNA-binding proteins and heterochromatin. LINC complex composed of nesprins and SUN proteins links the cytoskeleton with nucleoskeleton. Transport of proteins into the inner membrane is provided through the nuclear pore by several different mechanisms.

Keywords: nuclear envelope, emerin, LBR, LAP, MAN1, LINC, transport

Obsah

Abstrakt.....	iv
Seznam použitých zkratk.....	vi
1 Úvod.....	1
2 Membrána.....	2
2.1 Sfingomyelin	2
2.2 Ceramid.....	3
2.3 Gangliosidy	3
3 Proteiny vnitřní membrány	6
3.1 LEM proteiny	6
3.1.1 Lamina associated polypeptide 1 a 2 (LAP1 a LAP2).....	7
3.1.2 Emerin	8
3.1.3 MAN1	9
3.1.4 LEM2	10
3.1.5 Otefin.....	10
3.2 Nurim.....	10
3.3 Lamin B receptor (LBR)	11
3.4 Proteiny vnější membrány	15
3.4.1 LINC komplex.....	16
3.5 Transport a cílení proteinů do jaderné membrány	20
3.5.1 Difuzně-retenční model	20
3.5.2 Současný model	20
4 Jaderný pór (NPC)	23
5 Závěr	25
6 Literatura	26

Seznam použitých zkratk

4R	klastr čtyř argininů	four arginine motif
AP-2	transkripční faktor	activating protein 2
ATP	adenosintrifosfát	adenosintriphosphate
BAF	proteinový faktor propojující LEM	barrier-to-autointegration factor
BCL	proteiny, laminu a chromatin	B-cell lymphoma
BMP	lymfom B buněk	BCL-associated transcription
Btf	kostní morfogenetický protein	factor 1
CD	transkripční represor spojený s BCL	chromo domain
CDK1	chromodoména	cyclin-dependent kinase 1
cDNA	cyklin dependentní kináza 1	complementary DNA
CER	komplementární DNA	ceramide
CER-1-P	ceramid	ceramide-1-phosphate
CMV	ceramid-1-fosfát	cytomegalovirus
cNLS	cytomegalovirus	classic nuclear localization signal
CPM	klasický jaderný lokalizační signál	cytoplasmatic membrane
CSD	cytoplazmatická membrána	chromo shadow domain
DAG	stínová chromodoména	diacylglycerol
DNA	diacylglycerol	deoxyribonucleic acid
DP3	deoxyribonukleová kyselina	transcription factor DP3
E2F-DP	transkripční faktor DP3	transcription factor E2F-DP
ER	transkripční faktor E2F-DP	endoplasmic reticulum
F-aktin	endoplazmatické retikulum	filamentous actin
FG	filamentární aktin	phenylalanine-glycine
FRAP	fenyloalanin-glycin	fluorescence recovery after photobleaching
GAP	obnovení fluorescence po vysvícení	GTPase activating protein
GCL	protein aktivující GTPázu	germ cell-less
GEF	transkripční represor	guanine nucleotide exchange factor
GTP	guanosinový výměnný faktor	guanosintriphosphate
HA95	guanosintrifosfát	protein with high homology to the nuclear A-kinase anchoring protein
HDAC3	protein homologní k vazebnému proteinu proteinkinázy A	histon deacetylase 3
HP1	histon deacetyláza 3	heterochromatin protein 1
CH	protein asociovaný s	calponin homology
ID	heterochromatinem 1	intrinsically disordered
INM	doména obřích izoforem nesprinů 1 a 2	inner nuclear membrane
JCV	vnitřně neorganizovaná doména	JC virus
Kap	vnitřní jaderná membrána	karyopherin

KASH	doména nesprinů	Klarsicht, ANC-1 and SYNE
kDa	kilodalton	homology
LAP	polypeptid asociující s laminou	lamina associated polypeptide
LBR	receptor laminu B	lamin B receptor
LEM	doména nacházející se v proteinech LAP2, emerin, MAN1	LAP1, Emerin, MAN1
LINC	komplex propojující nukleoskelet a cytoskelet	linker of nucleoskeleton to cytoskeleton
Lmo7	protein účastnící se signální kaskády	lim-domain-only 7
mAKAP	protein kotvící kinázu A specifickou pro svalové buňky	muscle-specific A-kinase anchoring protein
MBD	doména vážící metylovanou DNA	methyl CpG binding domain
MeCP2	protein vážící metylované CpG ostrovy	methyl CpG binding protein 2
mRNA	informační ribonukleová kyselina	messenger ribonucleic acid
MSC	doména proteinu LEM2	MAN1-Src1p C-terminal
N-áza	neuraminidáza	neuraminidase
NCoR	jaderný korepresor receptorů	nuclear co-repressor
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ výměník	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
nesprin	protein jaderné membrány	nuclear envelope spectrin-repeat protein
Neu1	obsahující spektrínové opakování	neuraminidase 1
Neu3	neuraminidáza 1	neuraminidase 3
NFκB	neuraminidáza 3	nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells
NLS	transkripční faktor	nuclear localization signal
nm	jaderný lokalizační signál	nanometre
NPC	nanometr	nuclear pore complex
Nups	komplex jaderného póru	nucleoporins
Nurim	nukleoporiny	nuclear rim protein
O-GlcNAc	protein okraje jádra	O-linked N-acetylglucosamin
ONM	O-vázaný N-acetylglukosamin	outer nuclear membrane
pI	vnější jaderná membrána	isoelectric point
PKA	izoelektrický bod	protein kinase A
PKC	proteinkináza A	protein kinase C
	proteinkináza C	
	jaderná tělíska identifikována	
	původně u pacientů s promyeloidní	
PML bodies	leukemií	promyelitic leukaemia
Ran	jaderný protein příbuzný ras	ras-related nuclear protein
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
RRM	motiv rozeznávající RNA	RNA recognition motif
RS	arginin-serin	arginine-serine
S1P	sfinhosin-1-fosfát	sphingosine-1-phosphate
SF2	sestříhový faktor 2	splicing factor 2
siRNA	malá intererující RNA	small interfering ribonucleic acid

SM	sfingomyelin	sphingomyelin
SMáza	sfingomyelináza	sphingomyelinase
Sp1	transkripční faktor	specifity protein 1
SR	spectrinové opakování	spectrin repeat
SR-1, též TM7SF2 nebo		
DHCR14	sterolreduktáza 1	sterol reductase 1
SR-2, též DHCR7	sterolreduktáza 2	sterol reductase 2
SUN	doména SUN proteinů	Sad1 and UNC-84
SV40	opičí virus 40	simian virus 40
SYNE	geny kódující nespriny	nesprins encoding genes
TD	Tudor doména	Tudor domain
TGF- β	transformující růstový faktor β	transforming growth factor β
TRD	doména umlčující transkripci	transcriptional repression domain
UTR	netranslatovaná oblast	untranslated region
Wnt	protein účastnící se signální kaskády	Wingless/Int-1
Y2H	kvasinkový dvouhybridový systém	yeast two hybrid
YFP	žlutý fluorescenční protein	yellow fluorescent protein

1 Úvod

Jaderná membrána je bariéra obklopující buněčné jádro u Eukaryot. Tato kompartmentizace odděluje genom od cytoplazmy. Navíc tak umožňuje oddělit transkripci od translace, což dává buňkám více možností regulace genové exprese. Skládá se ze dvou lipidových dvojvrstev – vnitřní membrány a vnější membrány. Vnější jaderná membrána je pokračování drsného endoplazmatického retikula (ER). Mezimembránový prostor mezi těmito dvojvrstvami je pokračováním lumen ER. Vnitřní membrána obsahuje řadu unikátních membránových proteinů, které zajišťují řadu rozličných funkcí.

Transport do a z jádra je zajišťován velkými multiproteinovými komplexy jaderných pórů (NPC). V místě jejich průniku jsou vnitřní a vnější membrána propojeny. Během mitózy dochází k jejich rozložení, poté jsou znova skládány.

Pod vnitřní membránou uvnitř jádra se nachází jaderná lamina. Jedná se o 30-100 nm tlustou vláknitou síťovinu. Tvoří ji laminy (intermediální filamenta typu V) a asociovanými proteiny. Funkčně je důležitá pro mechanické vlastnosti jádra (Dahl et al. 2004). Též hraje roli v organizaci chromatinu, replikaci DNA a buněčném dělení. Laminy jsou proteiny velké 60-80 kDa, obsahující globulární N- a C-koncové domény a centrální α -helikální část. Helikální části dimerizují, a vytvářejí tak struktury vyššího řádu. Během mitózy je lamina depolymerizována. Laminy jsou dvojího typu – A/C a B (B1, B2). Laminy B1 a B2 jsou kódovány odlišnými geny. Laminy A a C vznikají alternativním sestřihem jednoho genu (Zorenc 1996). Laminy B obsahují na C-konci CaaX motiv, který je farnesylován a tím jsou ukotveny v membráně (Prüfert et al. 2004). B laminy jsou přítomny v savcích somatických buňkách a jsou esenciální pro růst buňky, kdežto laminy A/C se nacházejí jen v diferenciovaných buňkách (Riemer et al. 1995; Elbashir et al. 2001).

Při mitóze dochází k rozpadu jaderné membrány na vezikuly. Umožňuje to tak rozchod chromozomů do dceřiných buněk. Na konci buněčném dělení dochází k jejímu znovuvytvoření.

Zastoupení proteinů ve vnitřní a vnější jaderné membráně a jejich funkce nebyly dlouho známy. Souhrn informací o nich je hlavní náplní této práce.

2 Membrána

Lipidy jako celek představují asi jen 5% váhy jádra. V jaderné membráně lze nalézt řadu lipidů, které zajišťují strukturní funkci a též se podílí na signálních drahách a regulacích buněčných dějů. Řada novějších studií potvrzuje, že jaderná membrána je, s ohledem na lipidy metabolicky aktivní, a vyvrací tak dřívější představy, že se jádra metabolismus týká jen okrajově. Též bylo zjištěno, že i vnější stimuly jsou schopny spustit lipidovou signalizaci pouze v jádře (Cocco et al. 2001). Kromě membrány se v jádře vyskytují lipidy též v jadérku, jaderné matrix a chromatinu.

Jednotlivé membrány lze izolovat a od sebe oddělit (Gilchrist & Pierce 1993). Tímto bylo zjištěno například, že cholesterol se nacházel pouze ve vnější jaderné membráně, nikoliv však ve vnitřní (Alroy 1981; Kim & Okada 1983). Bylo zjištěno, že zastoupení jednotlivých lipidů ve vnější i vnitřní jaderné membráně zahrnuje podobné lipidy, liší se ale jejich relativní koncentrace (Keenan 1972; Jacqueline 1981).

2.1 Sfingomyelin

Sfingomyelin (SM) je fosfolipid skládající se z polární skupiny fosfocholinu, aminoalkoholu sfingosinu a mastné kyseliny. Samotný sfingosin s mastnou kyselinou se označuje jako ceramid (CER). Jeho přítomnost v jaderné membráně byla poprvé potvrzena u jater jaterních buněk (Jacqueline 1981; Keenan 1972). SM je pomocí enzymu sfingomyelinázy (SMáza) přeměňován na CER. SMáza byla poprvé objevena v jaderné-matrix buněk linie krysího hepatomu AH 7974 (Tamiyakoizumi et al. 1989) a později i v jaderné membráně (Alessenko & Chatterjee 1995). Nejprve je exprimována na NE a později při proliferaci nebo regeneraci jater se dostává i do jaderné-matrix (Alessenko & Chatterjee 1995).

SM syntáza katalyzuje přenos fosfocholinové skupiny z fosfatidylcholinu (z něj zůstává diacylglycerol – DAG) na ceramid (CER). Výskyt enzymu byl identifikován v chromatinu a jaderné membráně. Jedná se o dvě izoformy, které se odlišují pH optimem a aktivitou – enzym v chromatinu má 20x vyšší K_m než ten na jaderné membráně (Albi & Magni 1999). Enzym katalyzující reakci v opačném směru, než SM syntáza byl nalezen v jaderné matrix krysích hepatocytů (Albi et al. 2003). Tato reverzní reakce zvyšuje koncentraci CER a na rozdíl od SMázy zároveň snižuje koncentraci DAG a zvyšuje hladinu fosfatidylcholinu. Je tak ustanoven určitý poměr CER/DAG. Je vyšší

v chromatinu, než na jaderné membráně. Tato rovnováha a směr vychýlení může být důležitý pro buněčnou proliferaci a iniciaci apoptózy (Martelli et al. 2001).

2.2 Ceramid

Ceramid (CER) je primární produkt SMázy. V jádře slouží k signalizaci, s čímž jsou spjaty enzymy ceramidáza, sfingosinkináza a CER kináza). Koncentrační poměr CER a DAG je důležitý pro jadernou signalizaci. Tato signalizace v jádře je podobná té v cytosolu, kde proteinkináza C je aktivována DAG a inhibována CER a sfingosinem (Spiegel et al. 1996).

Při indukci apoptózy v jaterních buňkách krysy byla pozorována zvýšená aktivita jaderné SMázy. Docházelo tak ke zvýšení hladiny CER a sfingosinu v jádře, ale ne na cytoplazmatické membráně. Tato akumulace CER a sfingosinu v jádře může tedy spouštět apoptózu u hepatocytů (Tsugane et al. 1999).

Ceramidáza produkuje sfingosin. Ten bývá fosforylován na sfingosin-1-fosfát (S1P) (Spiegel et al. 1996). Sfingosinkináza 2 je lokalizována v jádře díky N-koncovému jadernému lokalizačnímu signálu (NLS) (Igarashi et al. 2003). S1P může sloužit jako druhý posel a též jako vněbuněčný ligand pro několik rodin receptorů spřažených s G proteiny. Podílí se na regulaci buněčné proliferace a při protiapoptotických procesech (Le Stunff et al. 2004). CER kináza tvoří CER-1-fosfát (CER1P), který v buňce hraje roli v regulaci Ca^{2+} , ale jeho přítomnost nebyla zjištěna v jádře. (Colina et al. 2005; Mitsutake & Igarashi 2005)

2.3 Gangliosidy

Gangliosidy jsou glykosfingolipidy obsahující sialovou kyselinu. Zatím nebyla provedena žádná velká studie pokrývající všechny typy gangliosidů. Analýza složení jaderných membrán jaterních buněk krys zjistila obsah gangliosidů asi 10 % množství, které se nachází v plazmatické membráně. Hlavní zjištěné gangliosidy byly GM1 a GM3 (Matyas & Morre 1987). Studie jaderných membrán buněk mléčné žlázy skotu odhalila výskyt gangliosidů GM3, GD3 a GT1b. (Katoh et al. 1993). Jaderné membrány izolované z krysích neuronů plně vyvinutého mozku obsahovaly nejvíce gangliotetróz (GM1), dále v menší koncentraci GM3 a gangliosidy c-typu. Neurony z vyvíjejících se mozků obsahovaly relativně více GM3 a GD3 (Saito & Sugiyama 2002).

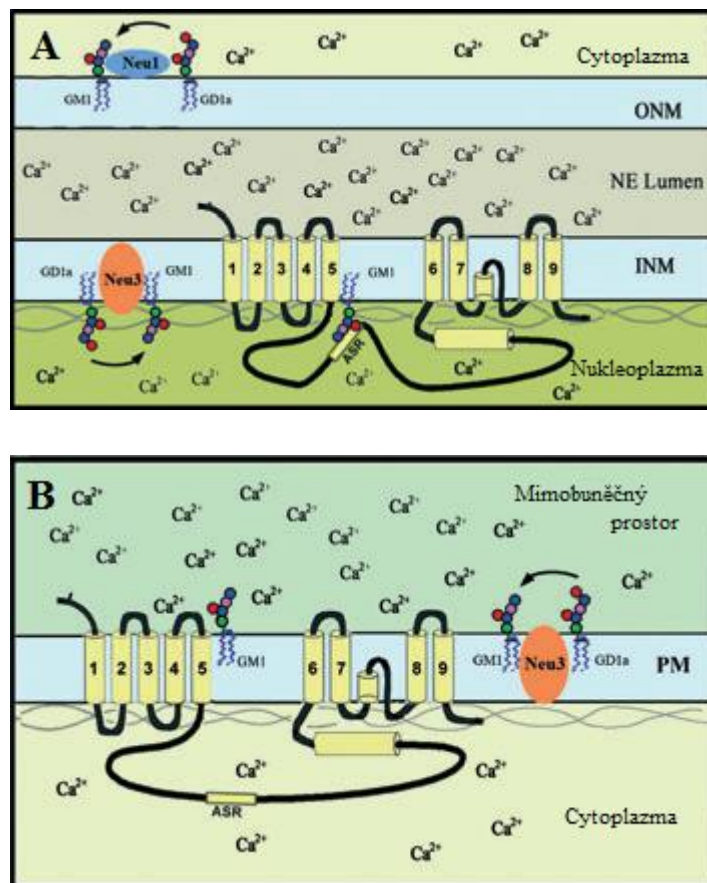
Gangliosidy GM1 a GD1a se vyskytují primárně v jaderné membráně, a také na cytoplazmatické membráně. GM1 hlavně u buněk stimulovaných k axonogenezi, u nediferencovaných se příliš nevyskytoval (Wu et al. 1995). Izolací jader a oddělením obou membrán bylo zjištěno, že vnitřní i vnější jaderná membrána obsahovala GM1 a GD1a (Xie et al. 2002). Hlavní funkce GM1 je regulace hladiny Ca^{2+} v jádře. Ve vnitřní membráně je asociován s $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníkem (NCX).

Gangliosid GD1a slouží jako prekurzor GM1. Tato reakce je katalyzována membránovým enzymem neuraminidázou (N-áza). Tento enzym se nachází v obou membránách ve dvou izoformách, jak bylo zjištěno metodou western blot a imunocytochemickou analýzou obou membrán, oddělených metodou podle (Gilchrist & Pierce 1993). Neu3 se nachází ve vnitřní a Neu1 ve vnější membráně. Na obou stranách je schopna katalyzovat tuto reakci (J. Wang et al. 2009)

Zmíněnými metodami bylo také zjištěno, že gangliosid GM1 asociuje v jaderné membráně s $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníkem (NCX). GM1 se též vyskytuje na cytoplazmatické membráně, kde však s NCX asociuje s menší afinitou, než na jaderné membráně. Funkce NCX byla ověřena pokusem s příjmem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ do izolovaných jader. Diferenciované buňky neuroblastomové linie NG108-15 mají vysoký obsah GM1 v jaderné membráně. Nediferenciované obsahují málo GM1, a tudíž NCX vykazuje nízkou aktivitu. Transport Ca^{2+} iontů probíhá díky gradientu Na^+ . Nejprve byla jádra naplněna Na^+ ionty (inkubací v médiu s ionofory). Tento transport probíhá pomocí Na^+/K^+ ATPázy ve vnitřní membráně (Garner 2002). Poté byla jádra inkubována v médiu s $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bez obsahu Na^+ . Byl sledován transfer $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z nukleoplazmy do mezimembránového prostoru jaderné membrány. Toto ukazuje na umístění NCX/GM1 ve vnitřní jaderné membráně. Experimentálně bylo umístění potvrzeno metodou western blot oddělených membrán. (Xie et al. 2002)

U NCX na plazmatické membráně probíhá výměna jednoho Ca^{2+} za 3 Na^+ , v důsledku čehož klesá v cytosolu koncentrace Ca^{2+} . Pro tento směr transportu je potřeba, aby polypeptidová smyčka mezi transmembránovými segmenty 5 a 6 byla na straně s nižší koncentrací Ca^{2+} – tedy na straně cytosolické (Philipson & Nicoll 2000). Pro NCX na vnitřní membráně je tato smyčka orientována směrem do nukleoplazmy. Ionty Ca^{2+} jsou transportovány do mezimembránového prostoru. V tomto případě však jsou oligosacharidová část GM1 i smyčka NCX orientovány do nukleoplazmy a ne na

opačných stranách membrány jako u CPM (viz obrázek č. 1). Při této topologii interaguje záporně nabitá část GM1 (sialová kyselina) s kladně nabitými aminokyselinovými zbytky na NCX, jak bylo ukázáno u některých izoform NCX (He et al. 1998)



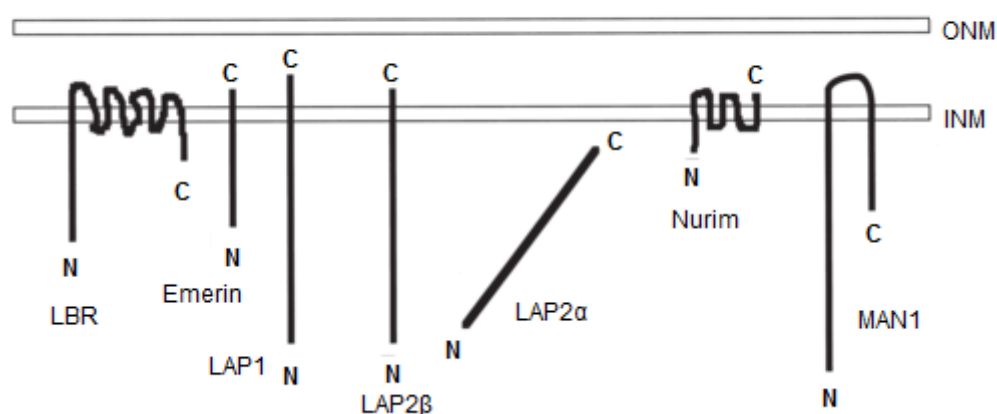
Obrázek č. 1: Topologie neuraminidáz (Neu1 a Neu3), Na⁺/Ca²⁺ výměníku (NCX) ve vnitřní jaderné membráně (INM) (A) a plazmatické membráně (PM) (B). Smyčka mezi transmembránovými segmenty 5 a 6 je orientována v obou případech na stranu s menší koncentrací Ca²⁺. Vysokoafinitní vazba GM1 s NCX v INM je zapříčiněna interakcí sialové kyseliny u GM1 s kladně nabitými zbytky alternativně sestřihované oblasti (ASR) NCX. Upraveno podle (Ledeen & Wu 2011)

Další funkcí, která je spjata s udržováním homeostázy Ca²⁺ je cytoprotekce. U myší s inaktivovaným genem pro GM2/GD2 syntázu docházelo k deficitu gangliosidů GM2, GD2 i všech gangliotetróz (včetně GM1) (Liu et al. 1999). Při zvýšené hladině K⁺ u kultury mozečkových granulárních neuronů těchto myší docházelo k extenzivní apoptóze (Wu et al. 2001). Tomu bylo zabráněno dodáním exogenního GM1 nebo ještě s větší efektivitou jeho semisyntetického analogu LIGA-20. Řetězec mastné kyseliny u ceramidu je nahrazen dichloroacetylem a díky tomu LIGA-20 prostupuje membránou a může se začlenit do jaderné membrány (Wu et al. 2004)

3 Proteom jaderné membrány

3.1 Proteiny vnitřní membrány

Jaderná membrána je tvořena dvěma morfologicky odlišnými, ale spojenými membránovými doménami. Vnější membrána je pokračováním drsného endoplazmatického retikula. Vnitřní membrána má unikátní složení integrálních membránových a asociovaných proteinů (viz obrázek č. 2), které též slouží jako vazebné místo pro lamin a chromatin. Mezimembránový prostor je pokračování lumen endoplazmatického retikula. Přesné složení proteomu jaderné membrány dlouho nebylo známo, až v poslední době přibývá poznatků o jednotlivých proteinech.



Obrázek č. 2: Topologie jednotlivých integrálních membránových proteinů vnitřní jaderné membrány (INM). Upraveno podle (Holmer & Worman 2001).

3.1.1 LEM proteiny

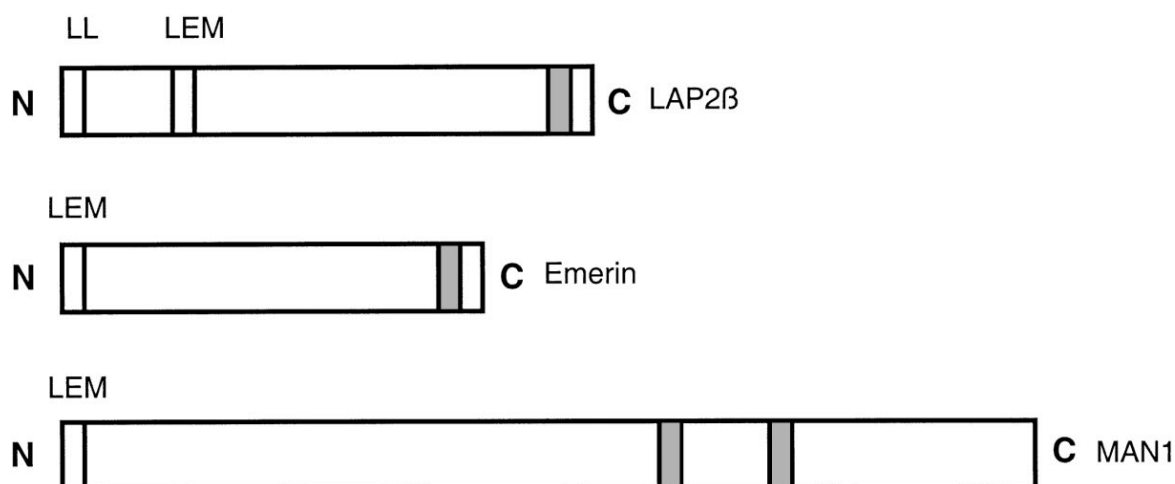
Proteiny LAP2, emerin a MAN1 obsahují LEM doménu (LAP2, emerin a MAN1) (viz obrázek č. 3) Tato doména je vysoce evolučně konzervovaná. LEM doména je 40 aminokyselin dlouhá, lokalizována na N-konci a je oddělena neglobulárními částmi. Predikovaná sekundární struktura je helix-loop-helix (Lin 2000). Hlavní funkcí LEM domény u eukaryot je vazba k proteinu BAF (barrier-to-autointegration factor)

(Margalit et al. 2007). Pro proteiny obsahující LEM doménu je typický funkční překryv. Vážou laminy a BAF, společně tak tvoří jadernou laminu.

3.1.1.1 Lamina associated polypeptide 1 a 2 (LAP1 a LAP2)

LAP1 (Lamina associated polypeptide) se vyskytuje ve třech izoformách – LAP1A (75 kDa), LAP1B (68 kDa) a LAP1C (55 kDa), které vážou laminy s různou afinitou (Senior & Gerace 1988).

LAP2 se též vyskytuje ve třech izoformách a to LAP2 α , LAP2 β , LAP3 γ . Izoformy LAP2 β a LAP3 γ jsou integrální membránové proteiny, LAP2 α neobsahuje transmembránovou doménu (Furukawa et al. 1995). Všechny LAP2 izoformy obsahují kromě LEM domény (zbytky 111-152) N-koncovou doménu podobnou doméně LEM (zbytky 1-50), která zprostředkovává interakci s chromatinem (Cai et al. 2001). LAP2 β má strukturu hydrofilní N-koncové domény délky 409 aminokyselin následované jedním transmembránovým úsekem. Jeho molekulová hmotnost je 53 kDa. Část mezi zbytky 208-409 asociuje s laminem B (Furukawa & Kondo 1998). Protein LAP2 α interaguje s tumor supresorovým retinoblastomovým proteinem (Markiewicz & Dechat 2002). Spolu s emerinem a proteinem MAN1 též asociuje s transkripčním represorem GCL (germ cell-less) (Holaska et al. 2003a).



Obrázek č. 3: Schematické znázornění členů rodiny LEM proteinů. LAP2 β obsahuje též doménu podobnou LEM (LL, LEM-like). Šedě jsou zakresleny transmembránové úseky.

Podle (Holmer & Worman 2001).

3.1.1.2 Emerin

Emerin byl objeven v souvislosti s Emery-Dreifuss svalovou dystrofií (Bione et al. 1994). Tento protein je řetězcem 254 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 34 kDa. Skládá se z N-koncové LEM domény, dále poly-serinové části dlouhé 100 aminokyselin následované hydrofobní doménou blízko C konce o délce 23 zbytků a malou lumenární doménou z 11 aminokyselinových zbytků.

Emerin vstupuje do ER post-translačně, není N-glykosylován ani není proteolyticky štěpen. Dva signály pro cílení do jaderné membrány jsou obsaženy v posledních 36 aminokyselinách a v N-koncové doméně. Emerin je syntetizován v cytoplazmě a poté je transportován do ER. (Ellis et al. 1998; Ostlund et al. 1999)

Kromě již zmíněné vazby BAF a laminů LEM doménou váže proteiny Btf (BCL-associated transcription factor 1) (Haraguchi et al. 2004), GCL (germ cell-less) (Holaska et al. 2003a) a HDAC3 (histon deacetylase 3) (Demmerle et al. 2012).

BAF je 89 aminokyselin (10 kDa) velký protein, konzervovaný u mnohobuněčných eukaryot (Segura-Totten & Wilson 2004). Slouží jako nezbytná součást jaderné laminy tím, že přímo váže proteiny s LEM doménou a spojuje tak jadernou membránu s DNA a histony H3, H4 a H1.1 (Montes de Oca et al. 2005). Také má vliv na post-translační modifikace histonů (Montes de Oca et al. 2011). U *C. elegans* připojuje chromatin k vnitřní jaderné membráně přes LEM proteiny, u savců toto není ověřeno. Dále je důležitý pro segregaci chromozomů, progresi buněčného cyklu a post-mitotické znovuvytváření jaderné membrány.

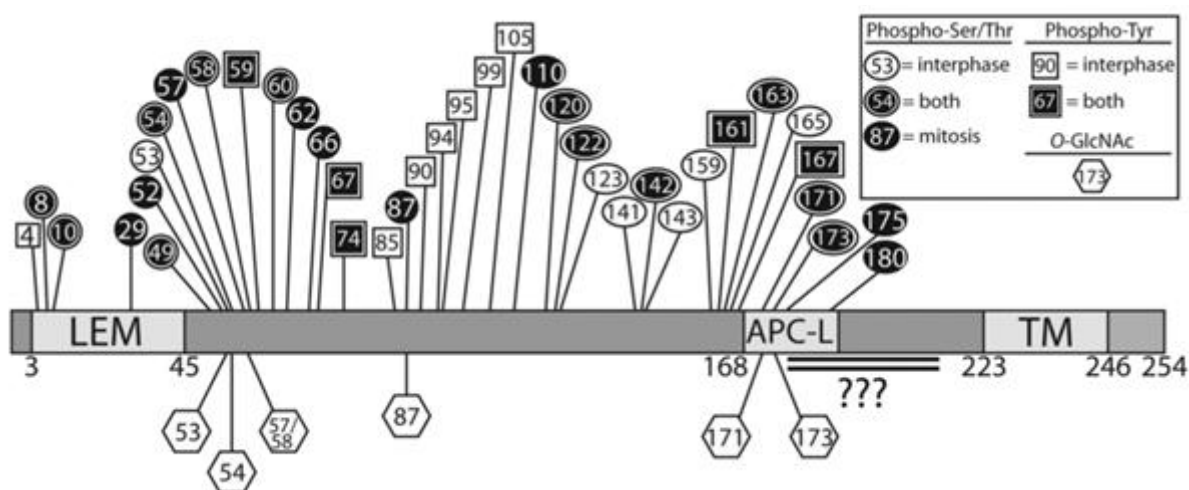
HDAC3 je součástí komplexu NCoR (nuclear co-repressor), který umlčuje transkripci genů navázáním se na chromatin. HDAC3 deacetyluje lysinové zbytky histonu H4. Asociace emerinu s tímto enzymem je zodpovědná za jeho lokalizaci u jaderné membrány a zvyšuje jeho aktivitu (Demmerle et al. 2012), což může být důležité pro tkáňově specifického umlčování genů.

Btf váže emerin a MAN1, hraje roli při odpovědi na poškození DNA, apoptóze, regulaci transkripce a vývoji. Při poškození DNA interaguje Btf s proteinkinázou C δ a aktivuje transkripci p53 navázáním se na promotor (Liu et al. 2007).

GCL kromě emerinu interaguje také s MAN1 a LAP2 β . Funkce GCL spočívá ve vazbě na DP3 podjednotku heterodimeru transkripčního faktor E2F-DP, které aktivují geny potřebné pro vstup buňky do S-fáze. Při asociaci LEM proteinů s GCL dochází k represí promotorů těchto genů (Holaska et al. 2003b).

Dále bylo zjištěno, že emerín může ovlivňovat sestřih mRNA vazbou na faktor asociovaný se sestřihem YT521-B (Wilkinson et al. 2003). Vazebnými partnery emerinu jsou též nespriny (Mislow et al. 2002) a proteiny obsahující SUN doménu (Haque et al. 2010a). Též se emerín může podílet na buněčné signalizaci. Byla popsána vazba emerinu na β -caterin (účastní se Wnt signalizace) (Markiewicz et al. 2006) a Lmo7 (Lim-domain-only 7) (Holaska et al. 2006). Tyto dráhy vazbou obou proteinů emerín inhibuje.

Emerín obsahuje 39 míst na fosforylaci *in vivo* (25 ser, 4 thr, 11 tyr). Během mitózy je fosforylovaný na 26 zbytcích. Přispívá to k rozpadu jaderné membrány. V interfázi je fosforylovaný na 30 zbytcích (viz obrázek č. 4) (Berk et al. 2013).



Obrázek č. 4: Emerín obsahuje 39 míst pro fosforylaci (25 ser, 4 thr, 11 tyr). Během mitózy je fosforylovaný, což přispívá k rozpadu jádra. Též je fosforylovaný i v interfázi. Podle (Berk et al. 2013).

3.1.1.3 MAN1

MAN1 je 82.3 kDa velký protein skládající se z N-koncové LEM domény, dvou hydrofobních transmembránových segmentů a z volného C konce. Oba konce směřují do nukleoplazmy. Bylo zjištěno, že gen pro tento protein se nachází na chromozomu 12q14

(Lin 2000). Též u něj bylo zjištěno, že váže laminy (Liu et al. 2003). Na úplném C-konci se nachází motiv rozeznávající RNA (RRM) (Mans & Anantharaman 2004).

Ortolog lidského MAN1 u *Xenopus* se podílí na signální dráze kostního morfogenního proteinu (BMP) jako antagonist vzhledem k Smad 1, 2 a 3 (Osada 2003). Lidský MAN1 se této dráhy též účastní. Dále hraje roli i při signalizaci přes transformující růstový faktor β (TGF- β) a aktivin. Váže faktory Smad 1, 2 a 3 pomocí RRM domény (Pan et al. 2005; Hellemans et al. 2004; Lin et al. 2005).

3.1.1.4 LEM2

LEM2 je lidský protein podobný MAN1, vykazuje s ním 83% identity a 87% sekvenční podobnosti. Obsahuje dva transmembránové úseky (zbytky 209-231 a 372-394), oba jeho konce jsou orientovány do nukleoplazmy. Na C-konci se nachází konzervovaná MSC (MAN1-Src1p C-terminal) doména. Na N-konci konzervovaná LEM doména. Váže lamin B a ke své správné lokalizaci potřebuje lamin A. Přílišná exprese tohoto proteinu měla za následek invaginace v jaderné membráně (Brachner et al. 2005). Použití siRNA proti LEM2 vedlo k jeho depleci pod detekovatelnou úroveň, což mělo za důsledek vznik jader abnormálních tvarů (Ulbert et al. 2006).

3.1.1.5 Otefin

Otefin byl objeven u octomilky, jako protein lokalizovaný v jaderné membráně (Harel et al. 1989). Předpovědi vycházející z primární struktury předpokládaly, že se jedná o integrální protein, který je převážně hydrofilní s hydrofobní částí na C-konci (Padan & Nainudel-Epszteyn 1990). Biochemické pokusy ale prokázaly, že otefin je periferální protein, přičemž hydrofobní doména se podílí na asociaci s membránou (Ashery-Padan & Weiss 1997). U otefinu byl též nalezen LEM motiv (Wagner et al. 2004).

3.1.2 Nurim

Nurim (nuclear rim protein) je protein složený z 262 aminokyselin, s celkovou molekulovou hmotností asi 29 kDa. Jeho předpovídaná struktura je pět transmembránových domén s krátkými smyčkami. Na rozdíl od ostatních lamin-vážících proteinů se liší v primární struktuře absencí charakteristické N-koncové nukleoplazmatické domény o délce nejméně 200 aminokyselin. Tato doména je též zodpovědná za cílení proteinu do vnitřní jaderné membrány. Cílení tohoto proteinu je tudíž zajišťováno jinak, avšak žádný nezávislý signál pro toto cílení nebyl nalezen. (Rolls

et al. 1999). V novější studii bylo zjištěno, že nurim zaujímá strukturu šesti transmembránových domén a vlásenkovité smyčky, přičemž N i C konce zůstávají na stejné straně (Hofemeister & O'Hare 2005).

3.1.3 Lamin B receptor (LBR)

Lamin B receptor (LBR) je integrální membránový protein II. typu s N koncem směřujícím do nukleoplazmy. Byl to též první objevený protein vnitřní jaderné membrány (Worman et al. 1988). Hlavní funkcí LBR je vazba laminu B a DNA (viz obrázek č. 5) (Ye & Worman 1994).

Lidský LBR je 615 aminokyselin dlouhý protein, vykazuje 68% identity s ptačím homologem. Bazická (pI 9.75) N-koncová doména je složena z 208 aminokyselin. C-koncová doména obsahuje předpovídaných 8 transmembránových úseků a je dlouhá 407 zbytků. N-koncová doména obsahuje fosforylační místa pro proteinkinázu A (PKA) a cyklin-dependentní kinázu 1 (CDK1). (Ye & Worman 1994)

Gen pro lidský LBR má 13 exonů, přičemž exony 1-4 kódují N-konec a 5-13 C-konec. Promotor tohoto genu neobsahuje TATA elementy. CAAT boxy a sekvence pro transkripční faktory Sp1, AP-2 a NFκB jsou přítomny. (Schuler et al. 1994)

Cílení LBR do vnitřní membrány je zajišťováno dvěma nezávislými nepřekrývanými signály. První se nachází v N-koncové doméně, druhý v prvním transmembránovém segmentu. N-koncový signál je podobný dvojdílnému signálu nukleoplazminu.

Imunoprecipitační pokusy identifikovaly unikátní kinázu LBR. Dalšími proteiny, u kterých bylo zjištěno, že tvoří komplex s LBR (kromě laminu A a B2) byly tehdy neznámé proteiny o velikosti 18; 34 a 150 kDa (Simos & Georgatos 1992). Další analýzou p18 bylo zjištěno, že se jedná o integrální membránový protein unikátní pro ptačí erytrocyty (Simos et al. 1996). Purifikací a částečným sekvenováním p34 odhalila tato výzkumná skupina homologii se savčím proteinem p32 asociujícím se sestřihovým faktorem 2 (SF2) (Simos & Georgatos 1994). Kináza fosforylující LBR (též RS kináza) fosforyluje aminokyseliny v oblasti LBR bohaté na argininy a seriny (RS oblast). Fosforylace těchto zbytků též zapříčiní disociaci p34 z komplexu (Simos 1996). Existuje možnost, že v důsledku použitých metod mohl tento komplex vzniknout jako experimentální artefakt. Jiná skupina dokázala, že p32 je ve skutečnosti mitochondriální

protein (Muta et al. 1997). Ovšem studie lidského cytomegaloviru (CMV) podporuje tvrzení, že p32 je v komplexu s LBR. Při výstupu CMV částic z jádra dochází k lokálním rozrušením jaderné laminy (fosforylací laminů) a následnému vypuštění virionů z jaderné membrány. CMV proteiny rekrutují proteinkinázu C (PKC) k jaderné membráně do komplexu s dalšími buněčnými proteiny – p32 a LBR. (Milbradt et al. 2009)

V pokusech s kvasinkovým dvouhybridovým systémem (Y2H) byla použita N-koncová doména lidského LBR (aminokyseliny 1-208) proti cDNA knihovně HeLa buněk. Jako nejpravděpodobnější hlavní vazebné partnery identifikovala tato metoda LBR lidské proteiny asociující s heterochromatinem – HP1 α a HP1 γ . (Worman & Ye 1996)

Skupina proteinů HP1 je součástí tzv. Polycomb skupiny. U člověka se HP1 vyskytuje ve třech izotypech – HP1 α , HP1 β a HP1 γ . U myši jsou tři izotypy nazývány mHP1 α , M31 a M31 (Jones et al. 2000; Cavalli & Paro 1998). Všechny varianty jsou velké cca 30 kDa a mají konzervované chromo domény. Obsahují N-koncovou chromo doménu (CD) (Singh et al. 1991; Paro & Hogness 1991) a C-koncovou stínovou chromo doménu (CSD – chromo shadow domain) (Aasland & Stewart 1995). Tyto domény mají strukturu trojvláknitých antiparalelních β -listů složených proti dvěma α -helixům, oddělených ohebnou pantovou částí. CSD se navíc oproti CD vyskytuje ve formě homodimerů (Ball et al. 1997; Brasher et al. 2000). HP1 proteiny mají řadu vazebných partnerů. Patří mezi ně proteiny účastnící se replikace DNA, proteiny vnitřní jaderné membrány (vazba pomocí CSD) a methylovaný histon H3 (vazba pomocí CD) (Hiragami & Festenstein 2005).

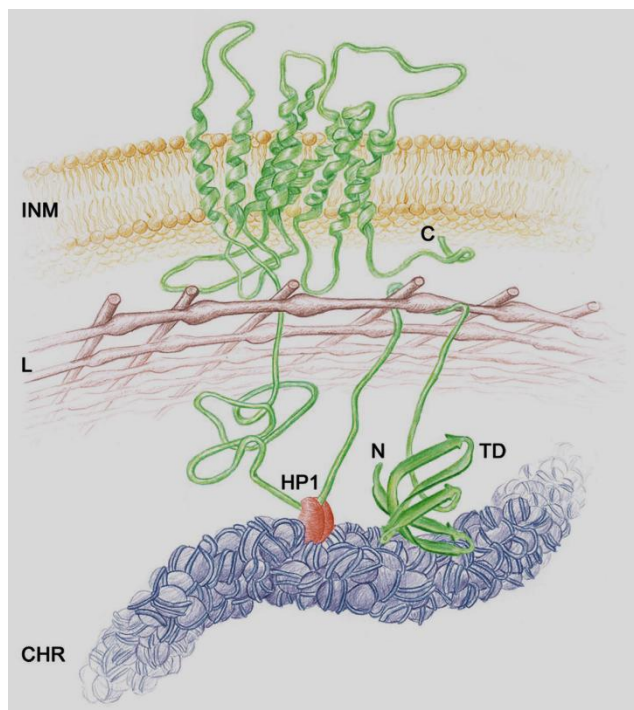
Pomocí analýzy hydrofobních klastrů bylo prokázáno, že N-koncová část lidského LBR (aminokyseliny 1-208) obsahuje dvě globulární domény (aminokyselinové zbytky 1-60 a 105-210) oddělené pantovou částí (zbytky 61-104). HP1 α pomocí své CSD interaguje s druhou globulární doménou LBR (zbytky 97-124). První globulární doména (zbytky 1-60) je důležitá pro interakci s laminem B (Ye et al. 1997). Bylo zjištěno, že řada jaderných proteinů obsahuje motiv PxVxL (prolin, valin a leucin oddělené jakoukoliv aminokyselinou – x), který váže přímo dimer CSD s vysokou afinitou. Existují i varianty tohoto motivu, které též váží CSD, jako je například u LBR (VxVxL). (Lechner et al. 2005)

V další studii bylo ukázáno, že agnoprotein lidského polyomaviru JCV vyvazoval HP1 z jeho vazby k LBR, což mělo za následek destabilizaci jaderné membrány. Tímto

přispívá agnoprotein k zprostředkování výstupu virionů z jádra bez nukleolýzy. Při pokusech s obnovením fluorescence po vysvícení (FRAP) měl vyvázaný LBR výrazně vyšší laterální motilitu, než v komplexu s HP1. (Okada et al. 2005)

Naproti tomu jiná skupina nepozorovala přímou interakci mezi LBR a HP1. Jejich *in vitro* pokusy poukazovaly na to, že histony H3/H4 zprostředkovávají tuto interakci a slouží tak jako můstek mezi těmito proteiny (Polioudaki et al. 2001). Dalším cílem této skupiny bylo zjistit, jaké epigenetické modifikace histonů jsou typické pro chromatin asociovaný s LBR. Histony koprecipitující s LBR analyzovali pomocí hmotnostní spektrometrie. H3 byl výrazně modifikován na zbytcích 9-17 a H4 dimetylován na lysinu 20 (Makatsori et al. 2004).

Při hledání proteinů na jaderné membráně, které rozpoznávají NLS a interagují s ním, bylo zjištěno, že LBR je jeden z nich. Jako model proteinu s NLS pro pokus byl použit fosfoprotein nukleoplazmin, sloužící jako chaperon a často asociující s jadérkem. Jako oblast LBR, která interaguje s NLS, byla identifikována arginin-serinová (RS) oblast (zbytky 54-89). Vazba k NLS byla ověřena kompeticí o vazbu s velkým T antigenem viru SV40 (Takeuchi et al. 1997). Dosud ale nebyla zjištěna žádná jasná funkce spjatá se schopností LBR vázat se k NLS jiných proteinů.



Obrázek č. 5: Ilustrace LBR v jaderné membráně. Je vyznačen chromatin (CHR), vnitřní jaderná membrána (INM), lamina (L), N a C konec LBR a jeho konzervovaná Tudor doména (TD). Je zde zobrazena interakce s HP1 – proteinem asociovaným s heterochromatinem.

Podle (Olins et al. 2010).

Dalším proteinem, u něhož byla zjištěna interakce s LBR je HA95. Je homologní k vazebnému proteinu proteinkinázy A (PKA), ale neváže PKA, protože postrádá vazebný motiv. HA95 koimunoprecipitoval v komplexu s LBR, LAP2 β a emerinem (Martins et al. 2000).

Heterochromatin je typický methylovanými histony H3, deacetylovanými histony H4 a methylací DNA. S heterochromatinem asociuje řada proteinů, jako je již zmíněný HP1 nebo protein vážící methylované CpG ostrovy (MeCP2) (Brero et al. 2005). MeCP2 je charakteristický dvěma doménami, methyl vázající doménou (MBD) a doménou reprimující transkripci (TRD). Rekrutuje histon deacetylázy a komplexy umlčující transkripci. (Leonhardt & Cardoso 2000; Bird & Wolffe 1999)

Konfokální mikroskopií byla pozorována kolokalizace LBR a se subpopulací proteinu MeCP2 nacházející se u jaderné membrány. Většina MeCP2 byla rozprostřena v celém jádře. Tato interakce byla ještě dále potvrzena purifikací obou proteinů ze stejné frakce jaderných membrán po působení nukleázy a extrakce pomocí soli a detergentu. Oba proteiny též spolu koimunoprecipitovaly, což potvrzuje, že spolu tvoří proteinový komplex. Metodou „pull-down assay“ bylo zjištěno, že MeCP2 s LBR interaguje pomocí smyčky spojující MBD a TRD (aminokyseliny 162-202) (Guarda et al. 2009). Asociace mezi proteiny LBR a MeCP2 může být důležitá zejména proto, že tím přivádí určité oblasti heterochromatinu k jaderné membráně a podílí se tak na umlčování transkripce.

Ve studii zabývající se rolí LBR při znovuvytváření jaderné membrány na modelu *Xenopus* bylo zjištěno, že jeho vazebným partnerem je i importin β . Jako vazebná část LBR pro importin β byla identifikována první globulární doména a část pantové oblasti (zbytky 45-90 u LBR *Xenopus*, tomu odpovídá 41-81 u LBR člověka). Tato vazba importinu β je důležitá k cílení prekursorů jaderné membrány k chromatinu při znovuvytváření jaderné membrány po ukončení mitózy. Též bylo zjištěno, že vazba importinu s LBR je regulována malou GTPázou Ran. Vazbou Ran-GTP ke komplexu LBR a importinu se tento komplex rozpadá (Ma et al. 2007).

Metodou založenou na hmotnostní spektrometrii byla identifikována post-translační modifikace LBR, přes O vázaná (O-linked) β -N-acetylglucosaminace (O-GlcNAc) na serinu 96 v N-koncové (nukleoplazmatické) části. Jedná se o dynamickou modifikaci, svým charakterem bližší fosforylaci, než O-glykosylaci. Zajišťují ji enzymy O-GlcNAc

tranferáza a O-GlcNAcáza. Význam této modifikace je zatím nejasný. Může hrát roli v protein-proteinových interakcích, případně skládání nebo funkci NPC. Tento serin je zároveň součástí arginin-serinové oblasti, což by mohlo být místo pro fosforylaci (Wells et al. 2002).

Schopnost vázat své partnery je u LBR během mitózy a interfáze regulována fosforylací RS oblasti. V těchto fázích buněčného cyklu je fosforylace odlišná. Je zajišťována RS kinázou a cyklin-dependentní kinázou 1 (CDK1) (Nikolakaki et al. 1997). Mitotická fosforylace znemožňuje vazbu partnerů k LBR, při znovuvytváření jaderné membrány po vstupu do interfáze je interakce znovu obnovena (Nikolakaki et al. 1996).

Při studiu LBR byla zjištěna podobnost jeho C-koncové části se sterol reduktázou (Schuler et al. 1994). V lidském genomu byly nalezeny 2 paralogní proteiny k C-konci LBR – proteiny SR-1 a SR-2. (Holmer et al. 1998). SR-1 (též TM7SF2 nebo DHCR14) vykazuje 58% shodných a 75% konzervovaných zbytků s LBR. Nese C-14 sterol reduktázovou aktivitu (Roberti et al. 2002). SR-2 (též DHCR7) má 37% stejných a 62% konzervovaných zbytků s LBR. Funkcí tohoto enzymu je přeměna 7-dehydrocholesterolu na cholesterol. Mutace v genu pro tento enzym mohou způsobit tzv. Smith-Lemli-Optizův syndrom. (Correa-Cerro & Porter 2005). První zmínka o klinické spojitosti se sterol reduktázovou aktivitou byla v souvislosti s HEM/Greenbergovou kosterní dysplazií. Jedná se o autozomálně recesivní utero-letální syndrom. Kožní fibroblasty plodu obsahovaly vysokou hladinu intermediátu biosyntetické dráhy cholesterolu. U pacientů s touto chorobou byl nalezen stop kodon v LBR genu v homozygotním stavu, tvořil se protein zkrácený o 82 C-koncových aminokyselin (Waterham et al. 2003).

3.2 Proteiny vnější membrány

Vnější jaderná membrána je pokračováním drsného ER. Většina proteinů vyskytující se v membráně ER je též zastoupena i ve vnější membráně, ale v jiné koncentraci. Nejtypičtějším proteiny vnější membrány jsou nespriny.

3.2.1 LINC komplex

LINC (Linker of nucleoskeleton to cytoskeleton) je multiproteinový komplex zprostředkující mechanické spojení cytoplazmatické a jaderné membrány. LINC zajišťuje tři hlavní funkce – připojuje jádro k cytoskeletu, zprostředkovává mechanotransdukci vnějších signálů do jádra a regulaci cytoplazmatických filament při pohybu, adhezi a ustavení polarity buňky.

Tento komplex se skládá z nesprinů (nuclear envelope spectrin-repeat proteins) obsahující doménu KASH (Klarsicht, ANC-1 and SYNE homology) a proteinů s doménou SUN (Sad1 and UNC-84). Lidské nespriny jsou kódovány čtyřmi geny – SYNE 1-4. Protein SUN je kódován třemi geny – SUN 1, 2, 3. Geny SYNE 1 a 2 jsou různě sestřihávány na různé izoformy nesprin-1/2 (Méjat & Misteli 2010; Mellad et al. 2011).

Nesprin 3 a obří izoformy nesprinu-1 a nesprinu-2 se nacházejí ve vnější jaderné membráně a interagují s jedním nebo více cytoskeletárními proteinů (plectin, filamentární aktin (F-aktin), a mikrotubulární motory. Lumenární KASH doména interaguje se SUN ve vnitřní membráně (viz obrázek č. 7).

Strukturu nesprinů tvoří centrální tyčovitá oblast variabilní délky obsahující různý počet spektrinových opakování (spectrin repeat; SR) a C-koncová transmembránová doména KASH (Klarsicht/ANC-1/Syne homology) (Warren et al. 2005). Dále jsou pro spektriny charakteristické motivy vázající cytoskeleton na N-konci. Jedno spektrinové opakování má strukturu tří α -helixových svazků (α -helix bundles) s levotočivou otočkou, hlavní funkcí je zprostředkování vazebných míst (docking sites) pro další proteiny (Parry et al. 1992; Yan et al. 1993).

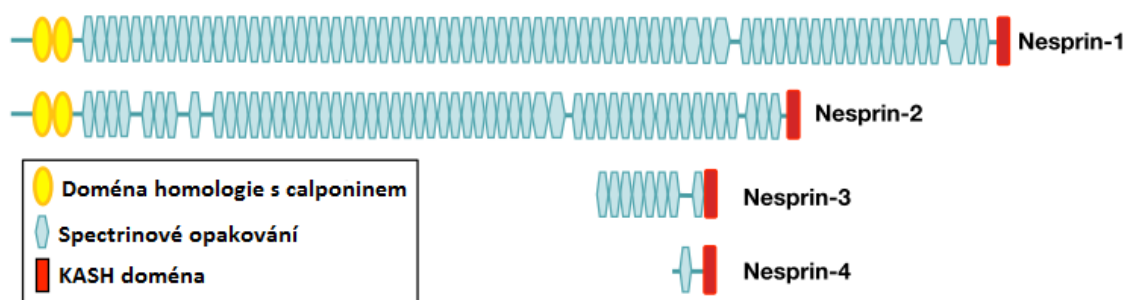
Obří izoformy nesprinu-1 (1 MDa) a nesprinu-2 (800 kDa) mají N-koncovou CH (calponin homology) doménu vázající F-aktin. Nesprin 3 (110 kDa) obsahuje motiv vázající plectin, který zprostředkovává interakce s cytoplazmatickými intermediálními filamenti (Wilhelmsen et al. 2005). Nesprin 4 nepřímo interaguje s mikrotubuly – váže podjednotku kif5b mikrotubulárního motoru kinesinu-1 (Roux et al. 2009).

Napojení na F-aktin je důležité pro mechanické vlastnosti celé buňky vzhledem k mechanotransdukci mezi cytoplazmou a jádrem (N. Wang et al. 2009). Bylo zjištěno, že chemikálie způsobující depolymerizaci F-aktinu (latrunculin B) a inhibici Rho kinázy

(která je klíčová pro regulaci organizace F-aktinu) způsobují narušení spojení aktinu s jádrem a tudíž defekty v morfologii jádra. Dále narušení LINC komplexu expresí dominantně negativní mutanty nesprinu mělo též za následek defekty v morfologii jádra (Khatau et al. 2009).

Nespriny byly objeveny jako nejnovější člen rodiny proteinů se spektrinovým opakováním (SR family), která mimo ně obsahuje – α -aktinin, α/β spektriny, dystrophiny a spektraplakiny. Rozděleny jsou podle unikátních strukturních domén, které umožňují specializované funkce.

Nespriny se svou C-koncovou doménou KASH vážou na C-konec trimerických proteinů SUN 1 a SUN 2 uvnitř lumen jaderné membrány (Sosa et al. 2012). N-konec SUN proteinů interaguje s jadernou laminou. Takovéto spojení mezi SUN a KASH doménami propojuje nukleoskelet s cytoskelem a tvoří tak LINC komplex.

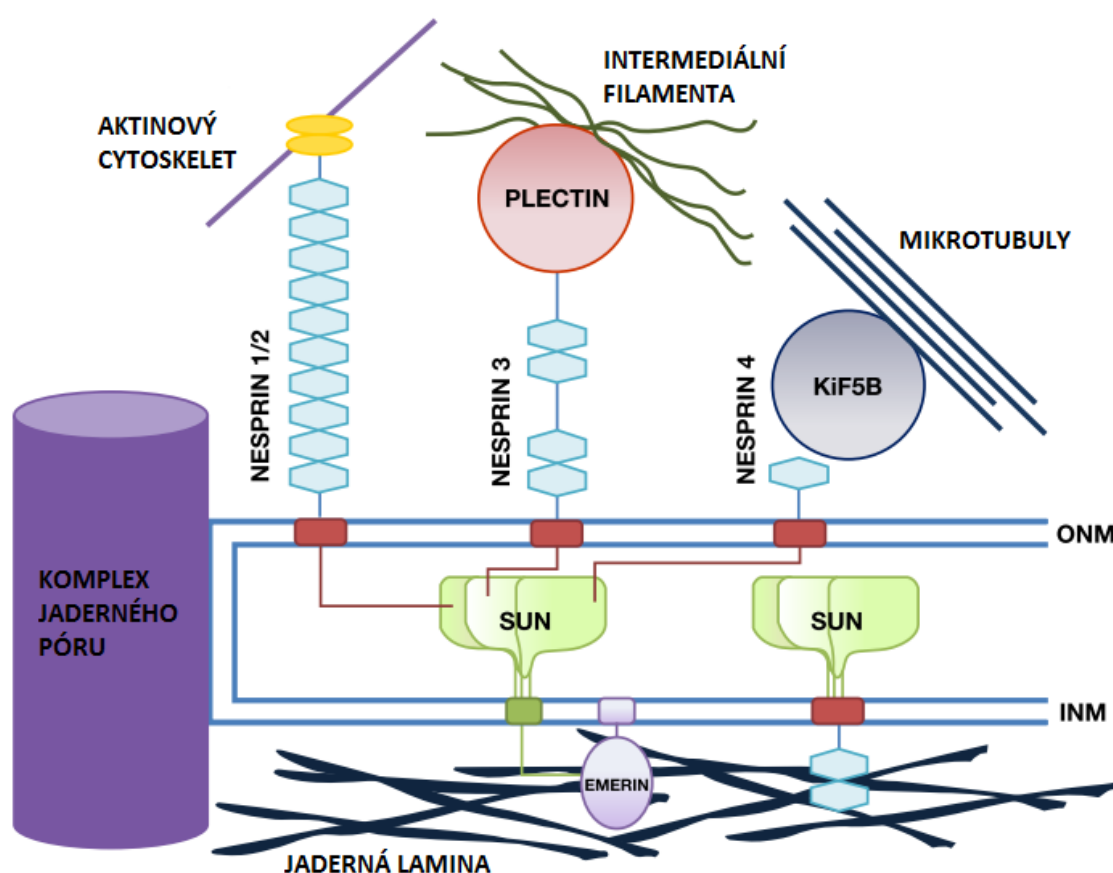


Obrázek č. 6: Nesprin-1 obsahuje 74 spektrinových opakování (SR), nesprin-2 56 SR, oba mají N-koncové CH domény pro vazbu F-aktinu. Nesprin-3 obsahuje 8 SR a interaguje s plectinem, pomocí něhož váže intermediální filamenta. Nesprin-4 má pouze jedno SR, váže podjednotku mikrotubulárního motoru kinesinu-1 kif5b. Podle (Rajgor & Shanahan 2013)

LINC dokáže vytvářet struktury vyššího řádu díky homo- a hetero-oligomerizaci mezi SUN a nespriny. Trimerní SUN proteiny interagují s nespriny ve stechiometrii 3:3 (Sosa et al. 2012). Toto však zatím ještě nebylo ověřeno *in vivo*. Teoreticky je možné, aby jakékoliv 3 druhy nesprinů párovaly se SUN trimerem – vzniká tím řada různých kombinací LINC komplexů a je tak možné zakotvení různých komponent podle tkáňově specifických izoform.

Nesprin-1 α , který se bohatě vyskytuje v srdeční, příčně pruhované a hladké svalovině, tvoří antiparalalní homodimery ve vnitřní jaderné membráně (Mislow et al. 2002), což může přispívat k zvýšení mechanické odolnosti jádra.

Nespriny nabývají množství izoform (viz obrázek č. 6). Hypoteticky je možných až 16 variant nesprinu-1 a 12 variant nesprinu-2 vzniklých kombinováním popsanych netranslatovaných 5'UTR oblastí s 3'UTR oblastmi obřích forem nesprinu-1 a nesprinu-2, po ukončení za KASH doménami. Dále bylo identifikováno několik tkáňově specificky exprimovaných izoform, avšak existence řady velkých variant nebyla dosud ověřena (Rajgor et al. 2012).



Obrázek č. 7: LINC komplex zprostředkovává propojení mezi jadernou laminou a cytoskeletem pomocí nesprinů. Tento komplex je složen z trimerních proteinů obsahující SUN doménu ve vnitřní jaderné membráně (INM), které asociují s laminou interakcemi s laminem A, emerinem a malými izoformami nesprinů. Velké izoformy nesprinů ve vnější jaderné membráně (ONM), asociující se SUN doménou v lumenárním prostoru pomocí KASH domény, připojují jadernou membránu k aktinu, intermediálním filamentům a mikrotubulům. (Rajgor & Shanahan 2013)

Analýzy proteomu potvrzují tkáňově specifickou expresi různých izoform nesprinů. Izoformy nesprinu-1 nabývají velikosti od 53 kDa až po 1000 kDa obří formu, u nesprinu-2 od 48 kDa po 800 kDa. U velkých nesprinových izoform se předpokládá lokalizace na vnější jaderné membráně, u menších i na vnitřní jaderné membráně (Korfali et al. 2012)

Izoformy nesprinů jsou dynamicky regulovány během buněčné diferenciaci a mohou být důležité pro vývojové procesy. Například během diferenciaci lidských myotubů dochází ke změně exprese větších izoform nesprinů ve prospěch menších, dochází ke změnám v LINC komplexech a tím ke změně fenotypu buňky z dynamického motilního na pevný stabilní kontraktilní fenotyp (Randles et al. 2010).

Bylo zjištěno, že některé izoformy nesprinů postrádají KASH doménu (Rajgor et al. 2012). Malé izoformy nesprinů obsahující KASH doménu, vzniklé alternativním sestřihem – nesprin-1 α a nesprin-2 β jsou schopny transportu do vnitřní jaderné membrány, kde tvoří silné interakce s laminy A/C, emerinem a signálními proteiny mAKAP (Mislow et al. 2002; Wheeler et al. 2007; Pare et al. 2005). Též asociují se SUN proteiny, ale místo interakce s jejich C-koncovou částí SUN domény interagují se sekvencemi blíže N-konci (Haque et al. 2006; Haque et al. 2010b).

Některé nespriny byly též nalezeny i v jiných buněčných kompartmentech, než je jaderná membrána. Protilátky proti nesprinům 1/2 je detekovaly i u jadérka, v Golgi aparátu, centrosomu, na stresových vláknech, jaderné matrix, heterochromatinu, v PML tělískách (promyelitic leukaemia bodies), na cytoplazmatické membráně. Dále byla zjištěna kolokalizace nesprinů s mitochondriem a endoplasmatickým retikulem. Některé tyto lokalizace byly pozorovány jen v určitých buněčných liniích. Tyto varianty postrádaly KASH domény. Byly tvořeny alternativní kombinací 5'UTR s 3'UTR genů pro nesprin 1/2 (Rajgor et al. 2012).

4 Transport a cílení proteinů do jaderné membrány

4.1 Difuzně-retenční model

Integrální membránové proteiny jsou syntetizovány na ribozomech asociovaných s endoplazmatickým retikulem. Jejich topologie je dána signálními a stop-transfer sekvencemi (Blobel et al. 1984). Proteiny dále podle signálních a retenčních sekvencí setrvávají v ER nebo jaderné membráně. Při cílení do vnitřní jaderné membrány musí proteiny překonat membránovou doménu jaderného póru přes laterální kanály NPC. Průměr těchto kanálů je asi 10 nm. Podle difuzně-retenčního modelu integrální proteiny drsného ER volně difundují spojenými membránami přes laterální kanály do vnitřní jaderné membrány i zpět. Vazbou na ligandy v jádře je zabráněno difuzi zpět do ER.

Studiemi na lamin B receptoru (LBR) bylo zjištěno, že LBR obsahuje dva nepřekrývané signály pro cílení do jaderné membrány. Každý z těchto signálů byl schopen zacílit integrální membránový protein typu II (C konec směřující do cytoplazmy) s původně jinou lokalizací do vnitřní jaderné membrány. Chimerické proteiny fúzované s jednou a dvěma N-koncovými doménami LBR (o velikosti 22,5 kDa), byly schopné laterální difuze přes NPC a lokalizace ve vnitřní jaderné membráně. Naproti tomu proteiny fúzované se třemi doménami už schopnost zakotvit ve vnitřní jaderné membráně neměly a shromažďovaly se v ER a cytoplazmatické membráně (Soullam & Worman 1995a). Toto ukazuje, že proteiny s nukleocytoplazmatickou doménou větší, než asi 67 kDa se nedokáží transportovat do vnitřní jaderné membrány, přestože obsahují signál, který je tam cílí. Všechny známé proteiny vnitřní jaderné membrány tuto doménu nemají větší, než 60 kDa.

4.2 Současný model

Jaderné periferální proteiny jsou asociovány s membránou pomocí protein-proteinových interakcí, pomocí amfipatického helixu nebo post-translačních modifikací. Jsou do jádra transportovány stejně jako solubilní proteiny. Na protein obsahující NLS se naváže karyopherin a je transportován přes jaderný pór. Karyopherinů existuje 14 rodin u kvasinek a přes 20 u mnohobuněčných živočichů (Mosammaparast & Pemberton 2004). Karyopheriny během přenosu interagují s nukleoporiny obsahující fenylalanin-glycinové opakování (FG). V jádře je náklad uvolněn navázáním Ran-GTP (Moore &

Blobel 1993; Stewart 2007). Touto malou GTPázou je regulován směr přenosu, v cytoplazmě se vyskytuje ve formě Ran-GDP, v jádře ve formě Ran-GTP.

Integrální membránové proteiny jsou v membráně kotveny transmembránovou částí a obsahují lumenární a cytosolickou doménu. Bylo popsáno, že se na jejich transportu do jaderné membrány účastní aktivní i pasivní mechanismy (Soullam & Worman 1995b; Ohba et al. 2004).

Pomocí technik obnovení fluorescence po vysvícení (FRAP) a fotoaktivace byla v rozsáhlé studii sledována pohyblivost 15 integrálních proteinů vnitřní membrány. Bylo zjištěno, že se uplatňují alespoň 4 mechanismy transportu: (i) mechanismus vyžadující ATP, ale ne Ran, (ii) vyžadující Ran, ale ne ATP, (iii) nevyžadující ani ATP, ani Ran a (iv) transport zprostředkovaný pomocí FG nukleoporinů, ale bez přispění Ran (Zuleger et al. 2011).

Závislost transportu na GTPáze Ran byla zkoumána na kvasinových proteinech Heh1 a Heh2 (ortology savčích MAN1 a LEM2). Při použití termosenzitivních mutant guanosinového výměnného faktoru (GEF) a proteinu aktivující GTPázovou aktivitu (GAP) Ran byl při teplotě 34 °C cyklus Ran narušen. Heh1 a Heh2 fúzované se žlutým fluorescenčním proteinem (YFP) za permissivní teploty byly lokalizovány primárně v jaderné membráně. Při nepermissivní teplotě se většina těchto proteinů nacházela v kortikálním ER. Tato mislokalizace byla reverzibilní (King et al. 2006).

Většina proteinů vnitřní jaderné membrány obsahuje klasický NLS (cNLS, podle NLS velkého T antigenu SV40), na který se vážou karyopheriny. Bylo zjištěno, že karyopheriny Kap60-Kap95 jsou nutné pro cílení do jaderné membrány. Pokud byl celý NLS proteinu Heh2 zaměněn za NLS rozeznávaný jinými karyopheriny (Kap123, Kap104 nebo Kap121), žádná z těchto variant nedokázala zajistit specifické cílení do jaderné membrány. Tato funkce je tedy zajišťována pomocí Kap60 a Kap95 (King et al. 2006). Jako oblast proteinů Heh1 a Heh2 interagující s karyopheriny byla identifikována vnitřně neuspořádaná (ID, intrinsically disordered) doména mezi transmembránovou doménou a NLS. Tato doména také umožňuje cytosolické doméně průchod NPC. Podobné ID domény existují i u dalších proteinů vnitřní jaderné membrány (Meinema et al. 2011). S těmito výsledky souhlasí i výzkum savčího proteinu SUN 2, jehož NLS váže

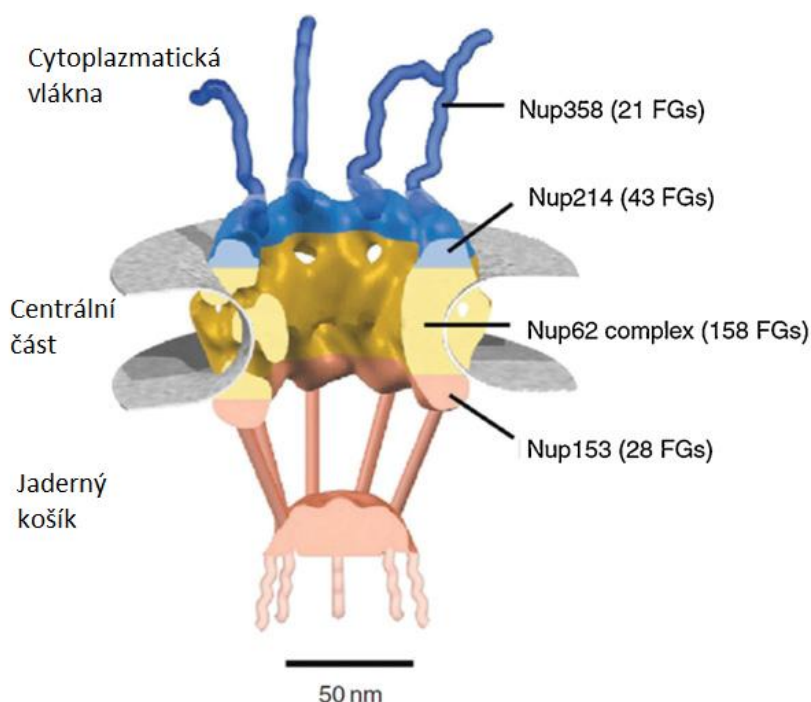
importin- α /importin- β (savčí ortology kvasinkových Kap60/Kap95) (Turgay et al. 2010).

Integrální proteiny s jedinou transmembránovou doménou, jako je lidský SUN2, mohou mít více požadavků na cílení do jaderné membrány. Jsou jimi bazický segment odpovídající klasickému NLS, C-koncová SUN doména a klastr čtyř argininů (4R motiv), sloužící jako lokalizační signál do ER. Zabraňuje akumulaci v Golgiho aparátu tím, že funguje jako vazebná platforma pro vazbu COPI (coatamer protein I). Poté je dopraven retrográdním transportem zpět do ER. SUN doména a NLS fúzované s heterologním proteinem byly dostatečné k cílení do vnitřní jaderné membrány. (Turgay et al. 2010). Tento mechanismus retrográdního transportu by mohl vysvětlovat spotřebu ATP během transportu do jaderné membrány (Braunagel et al. 2007). Další člen SUN rodiny u *C. elegans*, UNC-84 též potřebuje více lokalizačních signálů. Jsou jimi dva klasické NLS, třídící motiv pro vnitřní jadernou membránu (několik kladně nabitých aminokyselinových zbytků v transmembránovém segmentu) a lokalizační signál do jaderné membrány (Tapley et al. 2011).

5 Jaderný pór (NPC)

Jaderné póry (NPC) jsou komplexy velké 60-125 MDa u savců a 40-60 MDa u kvasinek. Skládají se z asi 30 různých proteinů, nazývaných nukleoporiny (Nups) (Cronshaw et al. 2002; Rout et al. 2000). Nacházejí se v jaderné membráně a v místě jejich průniku fúzuje vnitřní a vnější membrána. Jejich hlavní funkcí je zprostředkování transportu mezi jádrem a cytosolem, ale jednotlivé nukleoporiny mohou mít i další funkce.

Ionty a malé molekuly volně difundují skrz NPC. Molekuly větší, než 40 kDa jsou přenášeny aktivním transportem pomocí transportních receptorů za spotřeby energie ve formě GTP ve spolupráci s malou GTPázou Ran. Tyto transportní receptory interagují s doménami FG (opakování fenylalaninu a glycinu) nukleoporinů. Existuje několik modelů popisujících interakci mezi bariérou nukleoporinů obsahujících FG domény a transportovanou částicí (Kahms et al. 2011). V pokusech se zlatými nanočásticemi bylo zjištěno, že transportovat přes NPC je možné částice v průměru až 39 nm (Panté & Kann 2002).



Obrázek č. 8: Komplex jaderného póru obratlovců. Jsou znázorněny cytoplazmatická filamenta, centrální část a jaderná filamenta spojená v jaderný košík. Též jsou vyznačeny některé nukleoporiny (Nup) a počty FG opakování.

Upraveno podle (Kahms et al. 2011)

NPC je složen z proteinového lešení zakotveného v membráně, které obklopuje centrální kanál, cytoplazmatický a jaderný prstenec. K prstencům jsou připojena vlákna směřující do cytoplazmy a jádra; cytoplazmatická vlákna jsou volná, jaderná jsou spojena prstencem v jaderný košík (viz obrázek č. 8) (Suntharalingam & Went 2003).

Každý nukleoporin je vzhledem k oktagonálnímu tvaru póru zastoupen několikrát, většinou 8x, 16x nebo 32x. Nukleoporiny lze rozdělit do tří skupin, transmembránové ukotvující NPC k jaderné membráně, strukturní Nups a FG Nups. V nukleoporinech je možné nalézt struktury jako α -solenoid (superhelix α -helixů), „ β -propeller“ (4-8 antiparalelních β -listů uspořádaných toroidálně kolem centrální osy), fenylalanin-glycin (FG) opakování, „coiled coil“ (2-7 α -helixů svinutých do sebe) a transmembránové domény (Alber et al. 2007; Schwartz 2005). Kromě tří nukleoporinů, které jsou transmembránové a kotví NPC k membráně (u kvasinek (Ndc1p, Pom152p, Pom34p (Rout 2000)) jsou ostatní solubilní.

6 Závěr

V této práci bylo pojednáno o hlavních proteinech jaderné membrány s důrazem na jejich interakce a vazebné partnery. LBR asociuje s laminem B a DNA. Váže též proteiny asociované s heterochromatinem – HP1 a MeCP2. Jeho možnou funkcí je kotvení určitých částí heterochromatinu k jaderné membráně. Jeho C-koncová doména též slouží jako sterolreduktáza. LEM proteiny (Emerin, LAP, MAN1, LEM2) vážou BAF – proteinový faktor propojující laminu a chromatin. Emerin dále váže některé transkripční faktory, může se podílet na umlčování genů, sestřihu RNA a buněčné signalizaci. Hlavní funkcí LAP je asociace s laminy. MAN1 též váže laminy a hraje roli v signálních drahách BMP a TGF- β . LEM2 je jedním z proteinů zodpovědných za morfologii jádra. LINC komplex, složený z nesprinů a SUN proteinů zajišťuje propojení mezi jádrem a cytoskeletem, mechanotransdukci do jádra a regulaci cytoplazmatických filament. Lipidy jaderné membrány mají kromě strukturních funkcí též signální funkce. Gangliosid GM1 se podílí na regulaci koncentrace Ca^{2+} v jádře. Transport proteinů do vnitřní membrány není jen pasivní, jak se dříve myslelo. Je možných několik mechanismů transportu závislých i nezávislých na GTPáze Ran, ATP a nukleoporinech.

V posledních letech byla provedena řada velkoplošných proteomických studií (např. (Korfali et al. 2012; Wilkie et al. 2011)). V jaderné membráně tak bylo identifikováno více než 100 proteinů. Ovšem z toho je popsána pouze malá část. Mezi nejprozkoumanější proteiny patří emerina a LBR. Proteom jaderné membrány se liší v závislosti na buněčných typech. Různé metody studia jaderné membrány přinášejí rizika experimentálních artefaktů. Pro přesnou stavbu jaderného obalu a určení funkce všech jeho složek bude nutný další rozsáhlý výzkum využívající nejrůznější metody a přístupy.

7 Literatura

- Aasland, R. & Stewart, a F., 1995. The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic acids research*, 23(16), pp.3168–73.
- Alber, F. et al., 2007. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450(7170), pp.695–701.
- Albi, E., Lazzarini, R. & Magni, M.V., 2003. Reverse sphingomyelin-synthase in rat liver chromatin. *FEBS Letters*, 549(1-3), pp.152–156.
- Albi, E. & Magni, M. V, 1999. Sphingomyelin synthase in rat liver nuclear membrane and chromatin. *FEBS letters*, 460(2), pp.369–72.
- Alessenko, A. & Chatterjee, S., 1995. Neutral sphingomyelinase: Localization in rat liver nuclei and involvement in regeneration/proliferation. *Molecular and cellular biochemistry*, 143(2), pp.169–174.
- Alroy, J., 1981. Heterogeneous distribution of filipin-sterol complexes in nuclear membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 649(2), pp.239–243.
- Ashery-Padan, R. & Weiss, A., 1997. Distinct regions specify the targeting of otefin to the nucleoplasmic side of the nuclear envelope. *Journal of Biological ...*, 272(4), pp.2493–2499.
- Ball, L.J. et al., 1997. Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *The EMBO journal*, 16(9), pp.2473–81.
- Berk, J.M., Tifft, K.E. & Wilson, K.L., 2013. The nuclear envelope LEM-domain protein emerin. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 4(4), pp.298–314.
- Bione, S., Maestrini, E. & Rivella, S., 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 8(4), pp.323–327.
- Bird, a P. & Wolffe, a P., 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, 99(5), pp.451–4.
- Blobel, G., Walter, P. & Gilmore, R., 1984. Intracellular protein topogenesis. *Progress in clinical and biological research*, 168(3), pp.3–10.
- Brachner, A. et al., 2005. LEM2 is a novel MAN1-related inner nuclear membrane protein associated with A-type lamins. *Journal of cell science*, 118(Pt 24), pp.5797–810.
- Brasher, S. V et al., 2000. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *The EMBO journal*, 19(7), pp.1587–97.

- Braunagel, S.C. et al., 2007. Early sorting of inner nuclear membrane proteins is conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), pp.9307–12.
- Brero, A. et al., 2005. Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation. *The Journal of cell biology*, 169(5), pp.733–43.
- Cai, M. et al., 2001. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *The EMBO journal*, 20(16), pp.4399–407.
- Cavalli, G. & Paro, R., 1998. Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Current opinion in cell biology*, 10(3), pp.354–60.
- Cocco, L. et al., 2001. Nuclear phospholipase C and signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1530(1), pp.1–14.
- Colina, C., Flores, A. & Castillo, C., 2005. Ceramide-1-P induces Ca²⁺ mobilization in Jurkat T-cells by elevation of Ins (1, 4, 5)-P₃ and activation of a store-operated calcium. *Biochemical and ...*, 336(1), pp.54–60.
- Correa-Cerro, L.S. & Porter, F.D., 2005. 3beta-hydroxysterol Delta7-reductase and the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Molecular genetics and metabolism*, 84(2), pp.112–26.
- Cronshaw, J.M. et al., 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *The Journal of cell biology*, 158(5), pp.915–27.
- Dahl, K.N. et al., 2004. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *Journal of cell science*, 117(Pt 20), pp.4779–86.
- Demmerle, J., Koch, A.J. & Holaska, J.M., 2012. The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *The Journal of biological chemistry*, 287(26), pp.22080–8.
- Elbashir, S.M. et al., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), pp.494–8.
- Ellis, J. a et al., 1998. Aberrant intracellular targeting and cell cycle-dependent phosphorylation of emerin contribute to the Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype. *Journal of cell science*, 111 (Pt 6, pp.781–92.
- Furukawa, K. et al., 1995. Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *The EMBO journal*, 14(8), pp.1626–36.

- Furukawa, K. & Kondo, T., 1998. Identification of the lamina-associated-polypeptide-2-binding domain of B-type lamin. *European journal of biochemistry / FEBS*, 251(3), pp.729–33.
- Garner, M.H., 2002. Na,K-ATPase in the nuclear envelope regulates Na⁺: K⁺ gradients in hepatocyte nuclei. *The Journal of membrane biology*, 187(2), pp.97–115.
- Gilchrist, J.S. & Pierce, G.N., 1993. Identification and purification of a calcium-binding protein in hepatic nuclear membranes. *The Journal of biological chemistry*, 268(6), pp.4291–9.
- Guarda, A. et al., 2009. Interaction between the inner nuclear membrane lamin B receptor and the heterochromatic methyl binding protein, MeCP2. *Experimental cell research*, 315(11), pp.1895–903.
- Haque, F. et al., 2010a. Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *The Journal of biological chemistry*, 285(5), pp.3487–98.
- Haque, F. et al., 2010b. Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *The Journal of biological chemistry*, 285(5), pp.3487–98.
- Haque, F. et al., 2006. SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton
SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton.
- Haraguchi, T. et al., 2004. Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *European Journal of Biochemistry*, 271(5), pp.1035–1045.
- Harel, a et al., 1989. Persistence of major nuclear envelope antigens in an envelope-like structure during mitosis in *Drosophila melanogaster* embryos. *Journal of cell science*, 94 (Pt 3), pp.463–70.
- He, S. et al., 1998. Isoform-specific regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in rat astrocytes and neurons by PKA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(13), pp.4833–41.
- Hellemans, J. et al., 2004. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nature genetics*, 36(11), pp.1213–8.
- Hiragami, K. & Festenstein, R., 2005. Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(23), pp.2711–26.

- Hofemeister, H. & O'Hare, P., 2005. Analysis of the localization and topology of nurim, a polytopic protein tightly associated with the inner nuclear membrane. *The Journal of biological chemistry*, 280(4), pp.2512–21.
- Holaska, J.M. et al., 2003a. Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 278(9), pp.6969–75.
- Holaska, J.M. et al., 2003b. Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 278(9), pp.6969–75.
- Holaska, J.M., Rais-Bahrami, S. & Wilson, K.L., 2006. Lmo7 is an emerin-binding protein that regulates the transcription of emerin and many other muscle-relevant genes. *Human molecular genetics*, 15(23), pp.3459–72.
- Holmer, L., Pezhman, a & Worman, H.J., 1998. The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family. *Genomics*, 54(3), pp.469–76.
- Holmer, L. & Worman, H., 2001. Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(12-13), pp.1741–1747.
- Igarashi, N., Okada, T. & Hayashi, S., 2003. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *Journal of Biological ...*, 278(47), pp.46832–46839.
- Jacqueline, J., 1981. Analysis of the phospholipid of the nuclear envelope and endoplasmic reticulum of liver cells by high pressure liquid chromatography. *Lipids*, 16(7), pp.541–545.
- Jones, D.O., Cowell, I.G. & Singh, P.B., 2000. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(2), pp.124–37.
- Kahms, M. et al., 2011. Lighting up the nuclear pore complex. *European journal of cell biology*, 90(9), pp.751–8.
- Katoh, N., Kira, T. & Yuasa, A., 1993. Protein kinase C substrates and ganglioside inhibitors in bovine mammary nuclei. *Journal of dairy science*, 76(11), pp.3400–3409.
- Keenan, T.W., 1972. Lipid composition of further purified bovine liver nuclear membranes. *Lipids*, 7(3), pp.212 –215.
- Khatau, S.B. et al., 2009. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), pp.19017–22.

- Kim, J. & Okada, Y., 1983. Asymmetric distribution and temperature-dependent clustering of filipin-sterol complexes in the nuclear membrane of Ehrlich ascites tumor cells. *European journal of cell biology*, 29(2), pp.244–52.
- King, M.C., Lusk, C.P. & Blobel, G., 2006. Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature*, 442(7106), pp.1003–7.
- Korfali, N. et al., 2012. The nuclear envelope proteome differs notably between tissues. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 3(6), pp.552–64.
- Ledeen, R. & Wu, G., 2011. New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function. *Journal of neurochemistry*, 116(5), pp.714–20.
- Lechner, M.S. et al., 2005. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(4), pp.929–37.
- Leonhardt, H. & Cardoso, M.C., 2000. DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, Suppl 35, pp.78–83.
- Lin, F., 2000. MAN1, an Inner Nuclear Membrane Protein That Shares the LEM Domain with Lamina-associated Polypeptide 2 and Emerin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), pp.4840–4847.
- Lin, F. et al., 2005. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Human molecular genetics*, 14(3), pp.437–45.
- Liu, H. et al., 2007. Protein kinase C delta induces transcription of the TP53 tumor suppressor gene by controlling death-promoting factor Btf in the apoptotic response to DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 27(24), pp.8480–91.
- Liu, J. et al., 2003. MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), pp.4598–603.
- Liu, Y. et al., 1999. A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid storage disorder. *The Journal of clinical investigation*, 103(4), pp.497–505.
- Ma, Y. et al., 2007. Lamin B receptor plays a role in stimulating nuclear envelope production and targeting membrane vesicles to chromatin during nuclear envelope assembly through direct interaction with importin beta. *Journal of cell science*, 120(Pt 3), pp.520–30.

- Makatsori, D. et al., 2004. The inner nuclear membrane protein lamin B receptor forms distinct microdomains and links epigenetically marked chromatin to the nuclear envelope. *The Journal of biological chemistry*, 279(24), pp.25567–73.
- Mans, B. & Anantharaman, V., 2004. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell cycle*, 3(12), pp.1612–1637.
- Margalit, A. et al., 2007. Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. *Trends in cell biology*, 17(4), pp.202–8.
- Markiewicz, E. et al., 2006. The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *The EMBO journal*, 25(14), pp.3275–85.
- Markiewicz, E. & Dechat, T., 2002. Lamin A/C binding protein LAP2 α is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Molecular biology of ...*, 13(12), pp.4401–4413.
- Martelli, a M. et al., 2001. Re-examination of the mechanisms regulating nuclear inositol lipid metabolism. *FEBS letters*, 505(1), pp.1–6.
- Martins, S.B. et al., 2000. HA95 is a protein of the chromatin and nuclear matrix regulating nuclear envelope dynamics. *Journal of cell science*, 113 Pt 21, pp.3703–13.
- Matyas, G. & Morre, D., 1987. Subcellular distribution and biosynthesis of rat liver gangliosides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 921(3), pp.599–614.
- Meinema, A.C. et al., 2011. Long unfolded linkers facilitate membrane protein import through the nuclear pore complex. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6038), pp.90–3.
- Méjat, A. & Misteli, T., 2010. LINC complexes in health and disease. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 1(1), pp.40–52.
- Mellad, J. a, Warren, D.T. & Shanahan, C.M., 2011. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Current opinion in cell biology*, 23(1), pp.47–54.
- Milbradt, J. et al., 2009. Cytomegaloviral proteins that associate with the nuclear lamina: components of a postulated nuclear egress complex. *The Journal of general virology*, 90(Pt 3), pp.579–90.
- Mislow, J.M.K. et al., 2002. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS letters*, 525(1-3), pp.135–40.
- Mitsutake, S. & Igarashi, Y., 2005. Calmodulin is involved in the Ca²⁺-dependent activation of ceramide kinase as a calcium sensor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), pp.40436–40441.

- Montes de Oca, R., Andreassen, P.R. & Wilson, K.L., 2011. Barrier-to-Autointegration Factor influences specific histone modifications. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 2(6), pp.580–90.
- Montes de Oca, R., Lee, K.K. & Wilson, K.L., 2005. Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1. *The Journal of biological chemistry*, 280(51), pp.42252–62.
- Moore, M.S. & Blobel, G., 1993. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 365(6447), pp.661–3.
- Mosammaparast, N. & Pemberton, L.F., 2004. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends in cell biology*, 14(10), pp.547–56.
- Muta, T. et al., 1997. p32 Protein, a Splicing Factor 2-associated Protein, Is Localized in Mitochondrial Matrix and Is Functionally Important in Maintaining Oxidative Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), pp.24363–24370.
- Nikolakaki, E. et al., 1996. A nuclear envelope-associated kinase phosphorylates arginine-serine motifs and modulates interactions between the lamin B receptor and other nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry*, 271(14), pp.8365–72.
- Nikolakaki, E. et al., 1997. Mitotic Phosphorylation of the Lamin B Receptor by a Serine/Arginine Kinase and p34cdc2. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), pp.6208–6213.
- Ohba, T. et al., 2004. Energy- and temperature-dependent transport of integral proteins to the inner nuclear membrane via the nuclear pore. *The Journal of cell biology*, 167(6), pp.1051–62.
- Okada, Y. et al., 2005. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO reports*, 6(5), pp.452–7.
- Olins, A.L. et al., 2010. Lamin B receptor: multi-tasking at the nuclear envelope. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 1(1), pp.53–70.
- Osada, S.-I., 2003. XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development*, 130(9), pp.1783–1794.
- Ostlund, C. et al., 1999. Intracellular trafficking of emerin, the Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein. *Journal of cell science*, 112 (Pt 1, pp.1709–19.
- Padan, R. & Nainudel-Epszteyn, S., 1990. Isolation and characterization of the *Drosophila* nuclear envelope otefin cDNA. *Journal of Biological ...*, 265(14), pp.7808–7813.

- Pan, D. et al., 2005. The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines. *The Journal of biological chemistry*, 280(16), pp.15992–6001.
- Panté, N. & Kann, M., 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of ~ 39 nm. *Molecular biology of the cell*, 13(2), pp.425–434.
- Pare, G.C. et al., 2005. Nesprin-1alpha contributes to the targeting of mAKAP to the cardiac myocyte nuclear envelope. *Experimental cell research*, 303(2), pp.388–99.
- Paro, R. & Hogness, D.S., 1991. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(1), pp.263–7.
- Parry, D. a, Dixon, T.W. & Cohen, C., 1992. Analysis of the three-alpha-helix motif in the spectrin superfamily of proteins. *Biophysical journal*, 61(4), pp.858–67.
- Philipson, K. & Nicoll, D., 2000. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annual Review of Physiology*, 62, pp.111–133.
- Polioudaki, H. et al., 2001. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO reports*, 2(10), pp.920–5.
- Prüfert, K., Vogel, A. & Krohne, G., 2004. The lamin CxxM motif promotes nuclear membrane growth. *Journal of cell science*, 117(Pt 25), pp.6105–16.
- Rajgor, D. et al., 2012. Multiple novel nesprin-1 and nesprin-2 variants act as versatile tissue-specific intracellular scaffolds. *PloS one*, 7(7), p.e40098.
- Rajgor, D. & Shanahan, C.M., 2013. Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. *Expert reviews in molecular medicine*, 15(July), p.e5.
- Randles, K.N. et al., 2010. Nesprins, but not sun proteins, switch isoforms at the nuclear envelope during muscle development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 239(3), pp.998–1009.
- Riemer, D. et al., 1995. Expression of Drosophila lamin C is developmentally regulated: analogies with vertebrate A-type lamins. *Journal of cell science*, 108(Pt 10), pp.3189–98.
- Roberti, R. et al., 2002. Cloning and expression of sterol Delta 14-reductase from bovine liver. *European journal of biochemistry / FEBS*, 269(1), pp.283–90.
- Rolls, M.M. et al., 1999. A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *The Journal of cell biology*, 146(1), pp.29–44.

- Rout, M.P. et al., 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *The Journal of cell biology*, 148(4), pp.635–51.
- Roux, K.J. et al., 2009. Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), pp.2194–9.
- Saito, M. & Sugiyama, K., 2002. Characterization of nuclear gangliosides in rat brain: concentration, composition, and developmental changes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 398(2), pp.153–9.
- Segura-Totten, M. & Wilson, K.L., 2004. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends in cell biology*, 14(5), pp.261–6.
- Senior, a & Gerace, L., 1988. Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *The Journal of cell biology*, 107(6 Pt 1), pp.2029–36.
- Schuler, E., Lin, F. & Worman, H.J., 1994. Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *The Journal of biological chemistry*, 269(15), pp.11312–7.
- Schwartz, T.U., 2005. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Current opinion in structural biology*, 15(2), pp.221–6.
- Simos, G., 1996. A Nuclear Envelope-associated Kinase Phosphorylates Arginine-Serine Motifs and Modulates Interactions between the Lamin B Receptor and Other Nuclear Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), pp.8365–8372.
- Simos, G. & Georgatos, S., 1992. The inner nuclear membrane protein p58 associates in vivo with a p58 kinase and the nuclear lamins. *The EMBO journal*, 1(1), pp.4027–4036.
- Simos, G. & Georgatos, S.D., 1994. The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS letters*, 346(2-3), pp.225–8.
- Simos, G., Maison, C. & Georgatos, S.D., 1996. Characterization of p18, a Component of the Lamin B Receptor Complex and a New Integral Membrane Protein of the Avian Erythrocyte Nuclear Envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), pp.12617–12625.
- Singh, P.B. et al., 1991. A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic acids research*, 19(4), pp.789–94.
- Sosa, B. a et al., 2012. LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell*, 149(5), pp.1035–47.

- Soullam, B. & Worman, H.J., 1995a. Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *The Journal of cell biology*, 130(1), pp.15–27.
- Soullam, B. & Worman, H.J., 1995b. Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *The Journal of cell biology*, 130(1), pp.15–27.
- Spiegel, S., Foster, D. & Kolesnick, R., 1996. Signal transduction through lipid second messengers. *Current opinion in cell biology*, 8(2), pp.159–167.
- Stewart, M., 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(3), pp.195–208.
- Le Stunff, H., Milstien, S. & Spiegel, S., 2004. Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry*, 92(5), pp.882–99.
- Suntharalingam, M. & Wenthe, S.R., 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Developmental cell*, 4(6), pp.775–89.
- Takeuchi, M. et al., 1997. cDNA a Homologue of Human Nuclear of Lamin Protein Masaki We previously purified and characterized a nuclear localization signal (NLS) binding protein , NBP60 , in rat liver nuclear envelopes . In this study , we cloned and sequenced the cDNA of rat NB. *The Journal of Biochemistry*, 889, pp.881–889.
- Tamiyakoizumi, K. et al., 1989. Existence of Mg²⁺ -Dependent, Neutral Sphingomyelinase in Nuclei of Rat Ascites Hepatoma Cells. *The Journal of Biochemistry*, 106(4), pp.593–598.
- Tapley, E.C., Ly, N. & Starr, D. a, 2011. Multiple mechanisms actively target the SUN protein UNC-84 to the inner nuclear membrane. *Molecular biology of the cell*, 22(10), pp.1739–52.
- Tsugane, K. et al., 1999. A possible role of nuclear ceramide and sphingosine in hepatocyte apoptosis in rat liver. *Journal of hepatology*, 31(1), pp.8–17.
- Turgay, Y. et al., 2010. A classical NLS and the SUN domain contribute to the targeting of SUN2 to the inner nuclear membrane. *The EMBO journal*, 29(14), pp.2262–75.
- Ulbert, S. et al., 2006. The inner nuclear membrane protein Lem2 is critical for normal nuclear envelope morphology. *FEBS letters*, 580(27), pp.6435–41.
- Wagner, N., Schmitt, J. & Krohne, G., 2004. Two novel LEM-domain proteins are splice products of the annotated Drosophila melanogaster gene CG9424 (Bocksbeutel). *European journal of cell biology*, 82(12), pp.605–16.
- Wang, J. et al., 2009. Sialidase occurs in both membranes of the nuclear envelope and hydrolyzes endogenous GD1a. *Journal of neurochemistry*, 111(2), pp.547–54.

- Wang, N., Tytell, J.D. & Ingber, D.E., 2009. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(1), pp.75–82.
- Warren, D.T. et al., 2005. Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert reviews in molecular medicine*, 7(11), pp.1–15.
- Waterham, H.R. et al., 2003. Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. *American journal of human genetics*, 72(4), pp.1013–7.
- Wells, L., Vosseller, K. & Cole, R., 2002. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Molecular & Cellular ...*, 1(10), pp.791–804.
- Wheeler, M. a et al., 2007. Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Experimental cell research*, 313(13), pp.2845–57.
- Wilhelmsen, K. et al., 2005. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *The Journal of cell biology*, 171(5), pp.799–810.
- Wilkie, G.S. et al., 2011. Several novel nuclear envelope transmembrane proteins identified in skeletal muscle have cytoskeletal associations. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10(1), p.M110.003129.
- Wilkinson, F.L. et al., 2003. Emerin interacts in vitro with the splicing-associated factor, YT521-B. *European Journal of Biochemistry*, 270(11), pp.2459–2466.
- Worman, H.J. et al., 1988. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(22), pp.8531–4.
- Worman, H.J. & Ye, Q., 1996. Interaction between an Integral Protein of the Nuclear Envelope Inner Membrane and Human Chromodomain Proteins Homologous to Drosophila HP1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), pp.14653–14656.
- Wu, G. et al., 2001. Cerebellar neurons lacking complex gangliosides degenerate in the presence of depolarizing levels of potassium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), pp.307–12.
- Wu, G. et al., 2004. Susceptibility of cerebellar granule neurons from GM2/GD2 synthase-null mice to apoptosis induced by glutamate excitotoxicity and elevated KCl: rescue by GM1 and LIGA20. *Glycoconjugate journal*, 21(6), pp.305–13.
- Wu, G., Lu, Z. & Ledeen, R., 1995. Induced and spontaneous neuritogenesis are associated with enhanced expression of ganglioside GM1 in the nuclear membrane. *The Journal of neuroscience*, 15(5), pp.3739–3746.

- Xie, X. et al., 2002. Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *Journal of neurochemistry*, 81(6), pp.1185–95.
- Yan, Y. et al., 1993. Crystal structure of the repetitive segments of spectrin. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5142), pp.2027–30.
- Ye, Q. et al., 1997. Domain-specific Interactions of Human HP1-type Chromodomain Proteins and Inner Nuclear Membrane Protein LBR. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), pp.14983–14989.
- Ye, Q. & Worman, H.J., 1994. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. *The Journal of biological chemistry*, 269(15), pp.11306–11.
- Zorenc, a. H.G., 1996. An Alternative Splicing Product of the Lamin A/C Gene Lacks Exon 10. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16), pp.9249–9253.
- Zuleger, N. et al., 2011. System analysis shows distinct mechanisms and common principles of nuclear envelope protein dynamics. *The Journal of cell biology*, 193(1), pp.109–23.